

氏 名	木 下 浩 ^{きのしたひろし}
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 1845 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	STUDIES ON EXPRESSION MECHANISM OF YEAST CATALASE (酵母カタラーゼの発現機構に関する研究) (主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 田 中 渥 夫 教 授 森 島 績 教 授 今 中 忠 行

論 文 内 容 の 要 旨

真核生物には遺伝情報を担う核、エネルギーを生産するミトコンドリアなどの生体の生命活動の維持に必要な役割を分担する細胞内小器官が多種存在する。ペルオキシソームは哺乳動物においては肝細胞で発達が顕著である細胞内小器官であり、脂肪酸 β -酸化系などの各種代謝系を含んでいる。ペルオキシソーム内には遺伝情報を担う遺伝子が存在しないため、ペルオキシソームタンパクは核内の染色体上に存在する遺伝子から転写、翻訳の後、ペルオキシソームに局在化する必要がある。また、ペルオキシソームタンパクは多量体を形成していることが多いため、効率のよい多量体形成も機能発現には必要であると考えられる。カタラーゼはペルオキシソームに局在する四量体タンパクであり、補因子としてヘムを含んでいる。カタラーゼはペルオキシソームでの各種代謝系の酸化反応によって生じる生体に有害な活性酸素である過酸化水素を水と酸素に分解する酵素であり、生命維持に大きな役割を果たしている。本研究は、酵母カタラーゼの機能発現の機構を補因子ヘムとの関係に重点を置きながら解析したものであり、緒論、結論および本論3編5章よりなっている。

第1編では炭化水素資化性酵母 *Candida tropicalis* においてペルオキシソーム増殖条件下における細胞内ヘム量の変化を観察し、カタラーゼの発現とヘムのペルオキシソームへの局在化との関係を明らかにすることを目的としている。ペルオキシソーム誘導条件下での細胞内ヘム量の増加の大部分はカタラーゼの増加によって占められていることを明らかにし、さらに、ペルオキシソーム内では余剰のヘム、カタラーゼアポタンパクは存在しておらず、ペルオキシソームへの局在化の過程でヘムとカタラーゼの量を調節する機構が存在していることを示唆している。

第2編ではホストバクター系の確立しているパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて *C. tropicalis* のカタラーゼ遺伝子の発現系を構築し、カタラーゼの活性発現に及ぼすペルオキシソームの役割を明らかにすることを目的としている。第1章では *S. cerevisiae* でのペルオキシソーム非増殖条件下において *C. tropicalis* カタラーゼ遺伝子を発現させ、ペルオキシソームのカタラーゼ活性発現に対する役割についての知見を得ている。カタラーゼは *S. cerevisiae* の細胞質内でも活性体の四量体を形成できることを明らかにし、ペルオキシソームへの局在化がカタラーゼの活性化には必ずしも必要ではないということを明らかにしている。第2章ではペルオキシソーム誘導条件下で *C. tropicalis* カタラーゼ遺伝子を大量発現させ、ペルオキシソーム局在化時のカタラーゼアポタンパクとヘム量の調節機構に関して知見を得ている。*S. cerevisiae* でのペルオキシソーム増殖条件下で発現された *C. tropicalis* のカタラーゼは、細胞質内ではヘムの不足から活性のある四量体以外に不活性の多量体を形成しており、カタラーゼの四量体化にはヘムが不可欠であることを示唆している。さらにペルオキシソーム内においては活性体の四量体のみが存在しており、カタラーゼ活性を効率的に発現させるためにペルオキシソームには輸送過程においてカタラーゼアポタンパク量とヘム量を調節する機構が存在していることも示している。

第3編ではカタラーゼのヘムとの結合、四量体化と活性獲得との間の関係を明らかにすることを目的としている。第1章ではカタラーゼ活性に特異的な阻害剤 3-amino-1, 2, 4-triazol (3-AT) を用いることによりペルオキシソームへの局在化における四量体化と活性化に関して知見を得ている。ペルオキシソーム誘導中に 3-AT を加えた結果、カタラーゼのペル

オキシソームへの局在化は阻害されないが、免疫電顕等により、カタラーゼが不活性会合体を形成していることを明らかにしている。この3-ATの添加による不活性会合体の形成は完全な四量体を形成しているカタラーゼには起こらないこと、3-ATは活性のあるカタラーゼとのみ反応することから、ペルオキシソームにおいて完全な四量体を形成する以前に、カタラーゼは活性を有する構造を取り得ることを示唆している。第2章ではカタラーゼの変異体を構築することにより四量体化に必要な構造に関して知見を得ている。アミノ末端の一部を削除した変異体を作成した結果、49番目のアミノ酸までで形成するアミノ末端の α -helixがカタラーゼの四量体化に必要であり、また、末端の4アミノ酸が安定な四量体化に大きな影響を与えていることを明らかにしている。さらにカタラーゼアポタンパクは活性体の四量体化以前に正しい二次構造を形成しており、ヘムとの結合と、引き続いてのアミノ末端を介する相互作用により、安定な四量体を形成することを示している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、酵母のペルオキシソームタンパク質の機能発現機構を解明する研究の一環として、ヘムタンパク質であるカタラーゼについて解析したものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 炭化水素資化性酵母 *Candida tropicalis* のペルオキシソーム誘導下での細胞内ヘム量の変化を定量し、カタラーゼの活性発現との関係を明らかにした。

2. *C.tropicalis* カタラーゼ遺伝子をパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 内でペルオキシソーム非増殖条件下において発現させ、細胞質内でも活性体を形成できることを示した。

3. *S.cerevisiae* でのペルオキシソーム増殖条件下において *C.tropicalis* カタラーゼ遺伝子を発現させ、ペルオキシソームへの輸送過程においてカタラーゼアポタンパク量とヘム量を調節する機構が存在していることを示した。

4. *C.tropicalis* でのペルオキシソーム増殖中にカタラーゼの特異的な阻害剤 3-amino-1,2,4-triazol を加え、この阻害剤がカタラーゼのペルオキシソーム局在化には影響を及ぼさないが、不活性会合体を形成させ、カタラーゼはペルオキシソーム内で完全な四量体形成する前に活性を有することを示した。

5. *S.cerevisiae* を用いた発現系でカタラーゼのアミノ末端の一部を削除した変異体を発現させ、49番目のアミノ酸までで形成する α -helix がカタラーゼの四量体化に必要であること、四量体化しなくてもカタラーゼアポタンパクは正しい二次構造を形成し得ること、補因子ヘムの保持および活性の発現には四量体化が必要であることを明らかにした。

以上のように、本論文は主要なペルオキシソーム酵素であるカタラーゼについて、その機能発現と細胞内輸送に関して重要な成果を挙げたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成11年2月19日、論文内容とそれに関連する事項について試問を行った結果、合格と認めた。